

To Be Mailed

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-306228

(43)公開日 平成5年(1993)11月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	ADU	8314-4C		
A 2 3 L 1/30	B			
// C 0 7 H 15/256				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-129884

(22)出願日 平成4年(1992)4月24日

(71)出願人 591082421

丸善製薬株式会社

広島県尾道市向東町14703番地の10

(72)発明者 小塚 睦夫

京都府京都市上京区上御霊中町458番地

(72)発明者 徳田 春邦

京都府京都市左京区下鴨北園町3番地

(72)発明者 水谷 健二

広島県尾道市向東町14703-10丸善製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 板井 一穂

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 発癌プロモーション抑制剤

(57)【要約】

【構成】 グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩を有効成分とする。

【効果】 安全性が高いため、発癌予防用の薬剤として使用するだけでなく飲食品に添加して発癌予防に有効な機能性飲食品を製造するのにも有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩を有効成分として含有することを特徴とする発癌プロモーション抑制剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、発癌プロモーション抑制剤に関するものである。

【0002】

【従来技術】食物、タバコ等、環境中の化学物質による癌発症（化学発癌）の機構に関しては、近年、イニシエーションおよびプロモーションと呼ばれる二つの過程を経由する発癌二段階説が広く認められている。イニシエーションとは、イニシエーターと総称される作用物質が正常細胞のDNAに損傷を与えて潜在的腫瘍細胞に変化させる過程であり、プロモーションとは、プロモーターと総称される化学因子がイニシエーション過程で生じた潜在的腫瘍細胞に働きかけ、それを腫瘍に導く過程である。

【0003】そこで、イニシエーターおよびプロモーターを除去することにより、あるいはイニシエーションもしくはプロモーション過程を阻害することにより、発癌を抑制または予防する方法が可能であろうと考えられる。このような観点から、イニシエーターやプロモーターの探索が盛んに行われたが、これらは化学的に多様な物質であり、且つ我々のまわりを取り巻く環境中に広く存在しているため、完全に除去することは不可能に近い。また、イニシエーション過程の阻害についても広範な研究が行われているが、それが成功したとしても、正常細胞に復帰することのできない潜在的腫瘍細胞を既に保有するものにとっては有効な発症予防手段とはなり得ない。一方、プロモーションは長期にわたる過程であるため、その間に抑制が可能である。したがって、プロモーション過程を抑制する物質の探索こそが、発癌防止にきわめて重要な意味を持つことになる。

【0004】プロモーション過程抑制物質を探索する研究によって見いだされた有効物質の一つは、西野らが発見したグリチルレチン酸である〔Carcinogenesis, 5巻, 1529(1984)〕。この発見に基づき、米国ではグリチルレチン酸を添加した飲食品の開発が進められており、日常の飲食を通じて自然に発癌プロモーション抑制物質を摂取する方法による癌の予防が検討されている。しかしながら、グリチルレチン酸は甘草中に含まれている配糖体・グリチルリチンを加水分解して得られるアグリコン部分であり、水に不溶であるため、食品や飲料への添加および加工には困難がともなう。

【0005】グリチルレチン酸の配糖体であるグリチルリチンは、水溶性であるため加工および製剤化には問題がないが、既に安川ら〔Oncology, 48巻, 72 (1991)〕により報告されているように、その発癌プロモーション抑

制作用はそれほど強いものではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、天然物由来の安全性が高い物質の中から飲食品への添加や製剤化が容易で有効性においても優れている発癌プロモーション抑制物質を見だし、あらたな発癌予防手段を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明が提供することに成功した発癌プロモーション抑制剤は、グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩を有効成分とするものである。

【0008】グリチルレチン酸モノグルクロナイドは、グリチルレチン酸の配糖体多数について本発明者らが発癌プロモーション抑制作用を調べた結果顕著な有効性が確認された物質である。この化合物は、グリチルリチンを原料として、特開平4-23998号公報に記載されている酵素加水分解法により容易に製造することができるが、グリチルレチン酸とグルクロン酸から化学的な縮合反応によって合成することもできる。グリチルリチンの酵素加水分解によって得られる反応生成物は未反応のグリチルリチンを少量含有するが、前述のようにグリチルリチンもまた弱いながらも発癌プロモーション抑制作用を示すから、グリチルリチンが混在するグリチルレチン酸モノグルクロナイドを本発明のプロモーション抑制剤に使用しても差し支えない。

【0009】グリチルレチン酸モノグルクロナイドの発癌プロモーション抑制作用は、近年開発されたエプスタイン・バー・ウィルス早期抗原（EBV-EA）の誘発抑制作用を指標とする方法により確認された（後記実施例参照）。グリチルレチン酸モノグルクロナイドはそのままで本発明のプロモーション抑制剤に使用することができるが、水溶性塩すなわちナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、アンモニウム塩等は水に対する溶解性がよいので特に好ましい。

【0010】グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩は、それ単独で、あるいは他の薬品との合剤の形で、発癌プロモーション抑制剤とすることができる。グリチルレチン酸モノグルクロナイドは、経口、外用、注射のいずれの方法によっても投与可能であり且ついずれの方法によっても投与しても有効である。経口剤としては、散剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等、任意の剤形を採用することができる。外用剤の好適剤形は、液剤、軟膏剤である。注射剤としては、水またはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等の溶剤に溶かしたものをを用いることができる。

【0011】本発明の発癌プロモーション抑制剤の好適投与量は、年齢等により異なるが、通常、経口投与する場合で約5〜500mg/日、注射では約3〜300mg/日である。また、外用では約1〜10%の液剤もしくは軟

膏剤とする。マウスを用いた急性毒性試験によれば、グリチルレチン酸モノグルクロナイドは5,000mg/kgを経口投与しても死亡例は認められず、試験終了後の剖検でも異常は認められなかった。また、変異原性についてumu-遺伝子の発現を指標とした変異原性試験においても、変異原性は認められていない。以上により、グリチルレチン酸モノグルクロナイドの安全性はグリチルリチンと同様まったく問題ないと考えられている。

【0012】グリチルレチン酸モノグルクロナイドは強い甘味を呈する物質であり、また、食品に添加すると“塩馴れ”効果やフレーバー増強効果もあることが確認されているから、本発明のプロモーション抑制剤は種々の飲料や食品に添加して甘味付与や呈味改善と同時に発癌プロモーション抑制作用を付与する使用法が可能である。添加対象物に甘味付けされるのが望ましくない場合は、サイクロデキストリン等を用いて甘味の弱い包接化合物にしてから添加すればよい。

【0013】

【実施例】

実施例1

発癌プロモーターとして知られている種々の物質のうち \*

ウイルス・ゲノム発現阻害活性(%)

被験物質	被験物質濃度(モル比/TPA)			
	1000	500	100	10
グリチルレチン酸モノグルクロナイド	100	58.4	25.8	6.9
グリチルレチン酸	84.4	46.7	0	0
グリチルリチン	73.6	56.5	17.7	0

【0016】実施例2

グリチルレチン酸モノグルクロナイドのアンモニウム塩およびカリウム塩について、実施例1と同様の試験を濃度(モル比/TPA)1000倍量で行なった。その結果は次のとおりであった。

被験物質 ウイルス・ゲノム発現阻害活性

アンモニウム塩 100%

カリウム塩 100%

※

\*ち、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)は最も強力なものの一つである。以下の各例においては、EBVのゲノムを内蔵するパーキッリンバ腫由来の培養細胞であるRaji株を用いる下記の方法により、グリチルレチン酸モノグルクロナイドおよびその類縁化合物について上記発癌プロモーター・TPAによるEBVゲノムの発現を抑制する作用を検定した(培養細胞を用いるこの方法による試験結果は動物を用いたin vivoでの試験結果と一致することが確認されている。)

10 【0014】試験法:EBV-EA活性化抑制作用を、8%FBS RPMI1640培地で培養したEBV潜在感染ヒトリンバ芽球細胞Raji細胞を指示細胞として用いて調べた。指示細胞溶液は $1 \times 10^6$  cell/mlに調製し、これに4mMのn-酪酸、32pMolのTPA、および被験物質を加え、37℃で48時間培養した。その後、上喉頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法によりEBV-EAを染色し、被験物質を加えないコントロールに対する陽性細胞の率を算出し、ウイルス・ゲノムの発現阻害活性とした。その結果を表1に示す。

20 【0015】

【表1】

※【0017】

【発明の効果】上述のように、TPAによるEBV-EAの発現をグリチルレチン酸モノグルクロナイドが阻害する作用は極めて顕著であり、しかもグリチルレチン酸モノグルクロナイドの安全性は高いから、本発明のプロモーション抑制剤は発癌予防用の薬剤として使用するだけでなく飲食品に添加して発癌予防に有効な機能性飲食品を製造するのにも有用なものである。

【手続補正書】

【提出日】平成4年8月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、発癌プロモーション抑制剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】食物、タバコ等、環境中の化学物質による癌発症(化学発癌)の機構に関しては、近年、イニシエーションおよびプロモーションと呼ばれる二つの過程を経由する発癌二段階説が広く認められている。イニシエーションとは、イニシエーターと総称される作用物質

が正常細胞のDNAに損傷を与えて潜在的腫瘍細胞に変化させる過程であり、プロモーションとは、プロモーターと総称される化学因子がイニシエーション過程で生じた潜在的腫瘍細胞に働きかけ、それを腫瘍に導く過程である。

【0003】そこで、イニシエーターおよびプロモーターを除去することにより、あるいはイニシエーションもしくはプロモーション過程を阻害することにより、発癌を抑制または予防する方法が可能であろうと考えられる。このような観点から、イニシエーターやプロモーターの探索が盛んに行われたが、これらは化学的に多様な物質であり、且つ我々のまわりを取り巻く環境中に広く存在しているため、完全に除去することは不可能に近い。また、イニシエーション過程の阻害についても広範な研究が行われているが、それが成功したとしても、正常細胞に復帰することのできない潜在的腫瘍細胞を既に保有するものにとっては有効な発症予防手段とはなり得ない。一方、プロモーションは長期にわたる過程であるため、その間に抑制が可能である。したがって、プロモーション過程を抑制する物質の探索こそが、発癌防止にきわめて重要な意味を持つことになる。

【0004】プロモーション過程抑制物質を探索する研究によって見いだされた有効物質の一つは、西野らが発見したグリチルレチン酸である〔Carcinogenesis, 5巻, 1529(1984)〕。この発見に基づき、米国ではグリチルレチン酸を添加した飲食品の開発が進められており、日常の飲食を通じて自然に発癌プロモーション抑制物質を摂取する方法による癌の予防が検討されている。しかしながら、グリチルレチン酸は甘草中に含まれている配糖体・グリチルリチンを加水分解して得られるアグリコン部分であり、水に不溶であるため、食品や飲料への添加および加工には困難がともなう。

【0005】グリチルレチン酸の配糖体であるグリチルリチンは、水溶性であるため加工および製剤化には問題がないが、既に安川ら〔Oncology, 48巻, 72(1991)〕により報告されているように、その発癌プロモーション抑制作用はそれほど強いものではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、天然物由来の安全性が高い物質の中から飲食品への添加や製剤化が容易で有効性においても優れている発癌プロモーション抑制物質を見だし、あらたな発癌予防手段を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明が提供することに成功した発癌プロモーション抑制剤は、グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩を有効成分とするものである。

【0008】グリチルレチン酸モノグルクロナイドは、グリチルレチン酸の配糖体多数について本発明者らが発

癌プロモーション抑制作用を調べた結果顕著な有効性が確認された物質である。この化合物は、グリチルリチンを原料として、特開平4-23998号公報に記載されている酵素加水分解法により容易に製造することができるが、グリチルレチン酸とグルクロン酸から化学的な縮合反応によって合成することもできる。グリチルリチンの酵素加水分解によって得られる反応生成物は未反応のグリチルリチンを少量含有するが、前述のようにグリチルリチンもまた弱いながらも発癌プロモーション抑制作用を示すから、グリチルリチンが混在するグリチルレチン酸モノグルクロナイドを本発明のプロモーション抑制剤に使用しても差し支えない。

【0009】グリチルレチン酸モノグルクロナイドの発癌プロモーション抑制作用は、近年開発されたエプスタイン・バー・ウィルス早期抗原(EBV-EA)の誘発抑制作用を指標とする方法により確認された(後記実施例参照)。グリチルレチン酸モノグルクロナイドはそのままでも本発明のプロモーション抑制剤に使用することができるが、水溶性塩すなわちナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、アンモニウム塩等は水に対する溶解性がよいので特に好ましい。

【0010】グリチルレチン酸モノグルクロナイドまたはその水溶性塩は、それ単独で、あるいは他の薬品との合剤の形で、発癌プロモーション抑制剤とすることができる。グリチルレチン酸モノグルクロナイドは、経口、外用、注射のいずれの方法によっても投与可能であり且ついずれの方法によって投与しても有効である。経口剤としては、散剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等、任意の剤形を採用することができる。外用剤の好適剤形は、液剤、軟膏剤である。注射剤としては、水またはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等の溶剤に溶かしたものをを用いることができる。

【0011】本発明の発癌プロモーション抑制剤の好適投与量は、年齢等により異なるが、通常、経口投与する場合で約5〜500mg/日、注射では約3〜300mg/日である。また、外用では約1〜10%の液剤もしくは軟膏剤とする。マウスを用いた急性毒性試験によれば、グリチルレチン酸モノグルクロナイドは5,000mg/kgを経口投与しても死亡例は認められず、試験終了後の剖検でも異常は認められなかった。また、変異原性についてumu-遺伝子の発現を指標とした変異原性試験においても、変異原性は認められていない。以上により、グリチルレチン酸モノグルクロナイドの安全性はグリチルリチンと同様まったく問題ないと考えられている。

【0012】グリチルレチン酸モノグルクロナイドは強い甘味を呈する物質であり、また、食品に添加すると“塩馴れ”効果やフレーバー増強効果もあることが確認されているから、本発明のプロモーション抑制剤は種々の飲料や食品に添加して甘味付与や呈味改善と同時に発癌プロモーション抑制作用を付与する使用法が可能であ

る。添加対象物に甘味付けされるのが望ましくない場合は、サイクロデキストリン等を用いて甘味の弱い包接化合物にしてから添加すればよい。

#### 【0013】

##### 【実施例】

##### 実施例1

発癌プロモーターとして知られている種々の物質のうち、12-O-テトラデカノイルホルボー-13-アセテート（TPA）は最も強力なものの一つである。以下の各例においては、EBVのゲノムを内蔵するパーキットリンパ腫由来の培養細胞であるRaji株を用いる下記の方法により、グリチルレチン酸モノグルクロナイドおよびその類縁化合物について上記発癌プロモーター・TPAによるEBVゲノムの発現を抑制する作用を検定した（培養細胞を用いるこの方法による試験結果は動物を用いたin

vivoでの試験結果と一致することが確認されている。）。

【0014】試験法：EBV-EA活性化抑制作用を、8%FBS RPMI 1640培地で培養したEBV潜在感染ヒトリンパ芽球細胞Raji細胞を指示細胞として用いて調べた。指示細胞溶液は $1 \times 10^6$  cell/mlに調製し、これに4 mMのn-酪酸、3.2 pMolのTPA、および被験物質を加え、37℃で48時間培養した。その後、上喉頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法によりEBV-EAを染色し、被験物質を加えないコントロールに対する陽性細胞の率を算出し、ウイルス・ゲノムの発現阻害活性とした。その結果を表1に示す。

#### 【0015】

【表1】ウイルス・ゲノム発現阻害活性（%）

被験物質	被験物質濃度（モル比／TPA）			
	1000	500	100	10
グリチルレチン酸モノグルクロナイド	100	58.4	25.8	6.9
グリチルレチン酸	84.4	46.7	0	0
グリチルリチン	73.6	56.5	17.7	0

#### 【0016】実施例2

グリチルレチン酸モノグルクロナイドのアンモニウム塩およびカリウム塩について、実施例1と同様の試験を濃度（モル比／TPA）1000倍量で行なった。その結果は次のとおりであった。

被験物質      ウイルス・ゲノム発現阻害活性

アンモニウム塩      100%

カリウム塩      100%

#### 【0017】実施例3（マウス皮膚二段階発癌に対する抑制試験）

試験法：ICR雌性マウス（1群15匹）の背部皮膚に

7,12-dimethoxyl [a]-anthracene (DMBA) 390 nmolを塗布してイニシエートし、1週間後よりTPA 1.7 nmolの塗布を週2回、20週間行なった。被験物質はTPA塗布の60分前に同一部位に85 nmol塗布した。抑制効果は、腫瘍形成マウスの数および発生する腫瘍の数を調べ、被験物質を塗布しない対照群と比較した。試験結果を図1、図2および表2に示す。

#### 【0018】

【表2】

被験物質	発癌抑制率 (括弧内は1匹当り平均腫瘍数)		
	10週後	15週後	20週後
対照群	— (5.1)	— (8.2)	— (9.5)
グリチルレチン酸モノグルクロナイド	60.0% (1.9)	46.7% (3.7)	13.3% (4.7)
グリチルレチン酸	53.3% (2.8)	33.3% (5.0)	6.7% (6.0)
グリチルリチン	33.3% (3.8)	13.3% (6.1)	0% (6.9)

【0019】対照群ではプロモーション開始6週後から腫瘍が現れ、9週後にはすべてのマウスに腫瘍が生じたのに対し、被験物質投与群ではいずれも腫瘍の発生が2週間遅れ、被験物質に発癌プロモーション抑制作用があることを示した。中でもグリチルレチン酸モノグルクロナイドの作用は最も強く、既に活性が認められているグリチルレチン酸よりも高い発癌抑制率を示した。また、マウス1匹当りの平均腫瘍数においても、グリチルレチン酸モノグルクロナイド投与群では対照群の半分以下であった。

【0020】

【発明の効果】上述のように、TPAによるEBV-EAの発現をグリチルレチン酸モノグルクロナイドが阻害する作用は極めて顕著であり、しかもグリチルレチン酸モノグルクロナイドの安全性は高いから、本発明のプロモーション抑制剤は発癌予防用の薬剤として使用するだ

けでなく飲食品に添加して発癌予防に有効な機能性飲食品を製造するのにも有用なものである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】追加

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例3の試験結果を示すグラフである。

【図2】 実施例3の試験結果を示すグラフである。

【手続補正3】

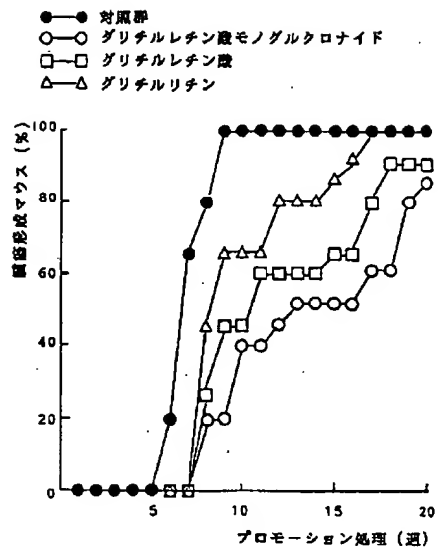
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

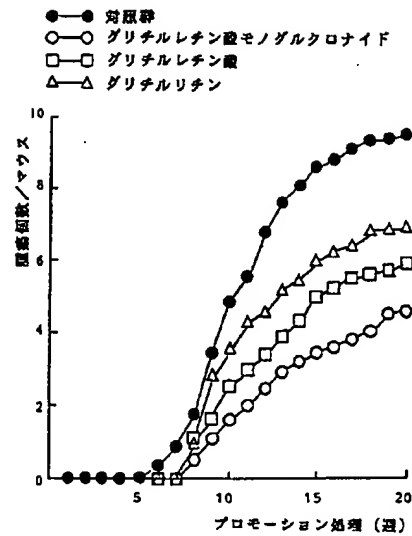
【補正方法】追加

【補正内容】

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 田村 幸吉  
広島県尾道市向東町14703-10丸善製薬株  
式会社内

(72)発明者 倉本 隆志  
広島県尾道市向東町14703-10丸善製薬株  
式会社内